

(19)



Europäisches Patentamt
Eur pean Patent Office
Office uropéen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 178 450
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 85111377.9

(51) Int. Cl.⁴: G01N 33/533 , G01N 33/574 ,
G01N 33/76 , C07F 15/00

(22) Anmeldetag: 09.09.85

(30) Priorität: 17.09.84 CH 4433/84
10.07.85 CH 2984/85

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
23.04.86 Patentblatt 86/17

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

(71) Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. Aktien-
gesellschaft

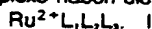
CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Müller, Francis
Seltisbergerstrasse 18
CH-4059 Basel(CH)
Erfinder: Schmidt, Dieter, Dr.
Redingstrasse 20
CH-4052 Basel(CH)

(74) Vertreter: Lederer, Franz, Dr. et al
Patentanwälte Dr. Lederer Franz Meyer-Roxlau Rei-
ner F. Lucile-Grahn-Strasse 22
D-8000 München 80(DE)

(54) Metallkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt werden kann bzw. ist, deren Herstellung und Verwendung.

(57) Es werden Rutheniumkomplexe beschrieben, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt werden kann bzw. ist. Die Rutheniumkomplexe haben die allgemeine Formel



worin L_1 , L_2 und L_3 gleich oder verschieden sind und je einen bi- oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L_1 , L_2 und L_3 über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

Die Liganden L_1 , L_2 und L_3 enthalten beispielweise 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin-, Benzobathophenanthrolin- oder Bathophenanthrolingruppen.

Die Spacergruppe ist beispielsweise eine Alkylengruppe mit höchstens 8 C-Atomen, die gegebenenfalls -SO₂-NH-, -S-, -O-, -COO- oder -CO-NH- aufweisen kann.

Als reaktive Gruppen, an die das immunologisch aktive Material gebunden wird kommen vorzugsweise -COOH, -J, -NH₂, -NCS oder -SO₂Hal Gruppen in Betracht.

Als immunologisch aktive Materialien, welche an die vorerwähnten Rutheniumkomplexe gekoppelt sind, kommen insbesondere Antigene, Haptene oder Antikörper, z.B. Antikörper gegen carcinoembryonale Antigen, in Betracht.

Die Rutheniumkomplexe gemäss vorliegende Erfindung lassen sich fluoreszenzspektroskopisch sehr empfindlich nachweisen.

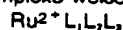
inf C07F15/00 N4B

EP 0 178 450 A2

Metallkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt werden kann bzw. ist, deren Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Rutheniumkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material g koppelt werden kann.

Die Rutheniumkomplexe weisen die allgemeine Formel



1 auf, worin L_1 , L_2 und L_3 gleich oder verschieden sind und je einen bi- oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L_1 , L_2 und L_3 über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

Die Liganden L_1 und L_2 können gleich oder verschieden sein und beispielsweise 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin-, Benzbathophenanthrolin- oder insbesondere Bathophenanthrolingruppen enthalten. Die Liganden L_1 und L_2 sind vorzugsweise gleich.

Als Gruppen, welche die Liganden wasserlöslich machen, kommen insbesondere Sulfonsäuregruppen in Betracht, die vorzugsweise in Form ihrer Salze vorliegen. Besonders bevorzugt sind hierbei die Natriumsalze.

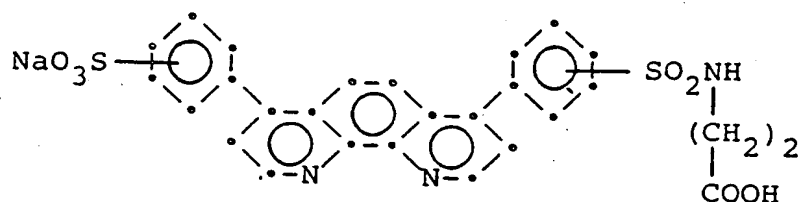
Der Ligand L_1 enthält beispielsweise eine 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin- oder insbesondere eine Bathophenanthrolingruppe.

Die eingangs erwähnte Spacergruppe ist vorzugsweise eine Alkylengruppe mit höchstens 8 C-Atomen, die gegebenenfalls $-\text{SO}_2$, $-\text{NH}-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{COO}-$ oder $-\text{CO}-\text{NH}-$ aufweisen kann.

Als reaktive Gruppen, an die das immunologisch aktive Material gebunden wird, kommen vorzugsweise $-\text{COOH}$, $-\text{J}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NCS}$ oder $-\text{SO}_2$ Hal Gruppen in Betracht.

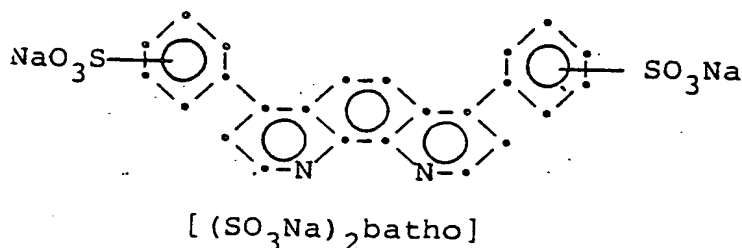
Bei Ru-Komplexen mit 3 identischen Liganden L_1 , L_2 und L_3 muss der Ligand sowohl eine wasserlöslich machende Gruppe wie auch eine Spacergruppe mit reaktiver Gruppe aufweisen.

Ein hierfür geeigneter Ligand ist die Verbindung der Formel $[(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$

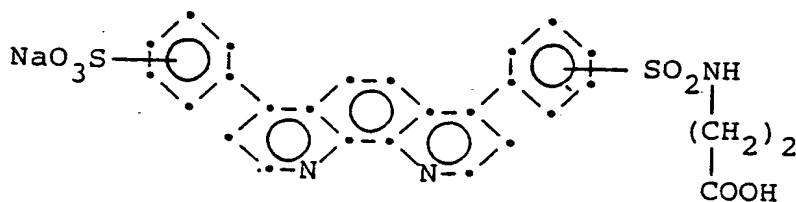


Bei Ru-Komplexen, die zwei verschiedene Ligandtypen aufweisen, kann der eine Ligandtyp die wasserlöslich machende Gruppe oder Gruppen tragen, während der andere Ligandtyp über eine oder mehrere Linkinggruppen (reaktive Gruppe, die über einen Spacer an Heterocyclen gebunden ist) verfügt.

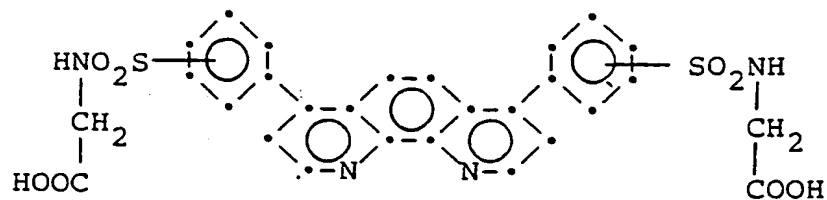
Als Liganden L_1 und L_2 eignen sich in diesem Falle vorzüglich die Gruppen der Formel



und als Ligand L_3 vorzugsweise die folgenden Gruppen $[(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$

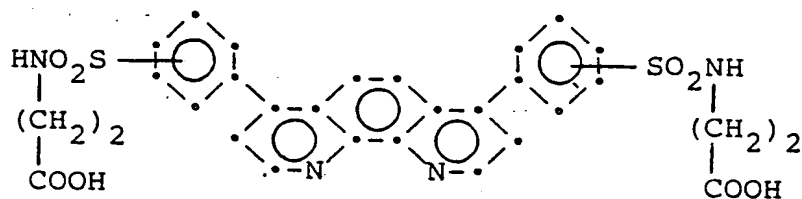


[(SO₂NH CH₂COOH),batho]



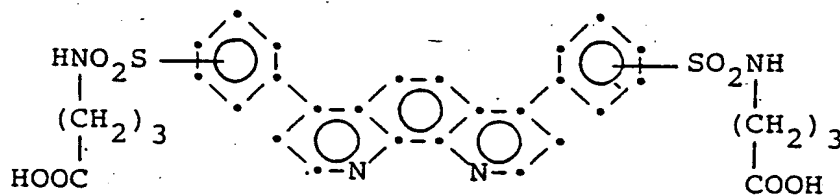
[(SO₂NH CH₂CH₂COOH),batho]

15



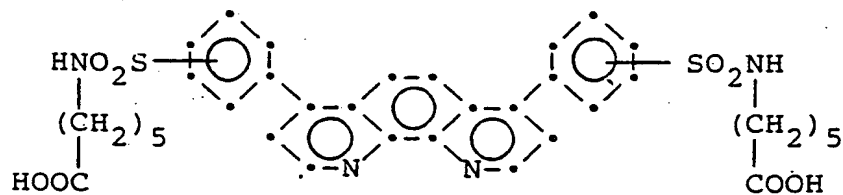
25

[(SO₂NH CH₂CH₂CH₂COOH),batho]



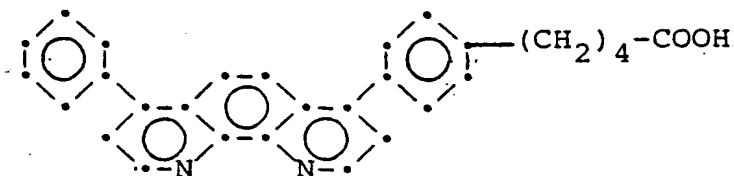
[(SO₂NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH),batho]

40



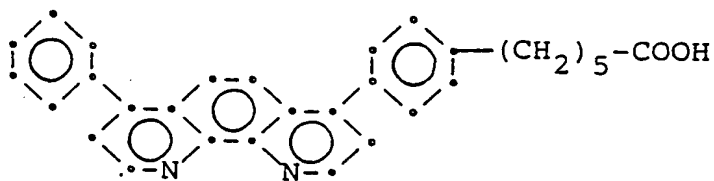
[(CH₂CH₂CH₂CH₂COOH)batho]

55



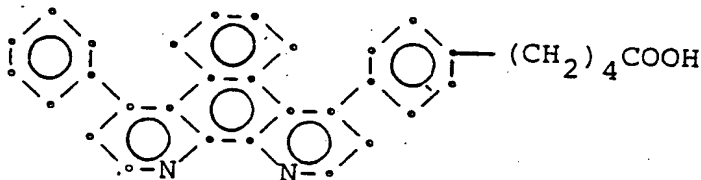
[(CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH)batho]

65



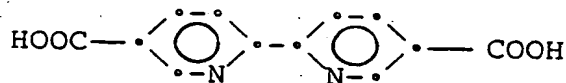
10

$[(CH_2CH_2CH_2CH_2COOH)_{\text{batho}}]$



25

$[(COOH)_4\text{bpy}]$



Die Synthese der Liganden L., welche die Linking Gruppe bzw. Gruppen tragen, erfolgt nach Verfahren, die nachfolgend schematisch beschrieben sind:

a) $[(SO_3NH(CH_2)_xCOO-t\text{-butyl})_{\text{batho}}]$ und $[(SO_3Na)(SO_3NH(CH_2)_xCOO-t\text{-butyl})_{\text{batho}}]$

Bei der Synthese dieser Verbindungen geht man vom Dinatrium-Salz der Bathophenanthrolindisulfonsäure aus. Daraus stellt man mit PCl_5 zunächst das entsprechende Disulfochlorid her (vgl. F. Muth in "Houben-Weyl, Methoden

35

der Organischen Chemie", Band IX, S. 563, 4. Auflage: 1955, G. Thieme Verlag, Stuttgart). Dieses wird anschließend mit dem t-Butylester einer Aminosäure (wie z.B. β -Alanin, Glycin, 4-Aminobuttersäure oder 6-Aminocapronsäure) gemäß folgendem Schema zum entsprechenden Sulfonamid umgesetzt (vgl. F. Muth in "Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie", Band IX, S. 609, 4. Auflage: 1955, G. Thieme Verlag, Stuttgart):

45

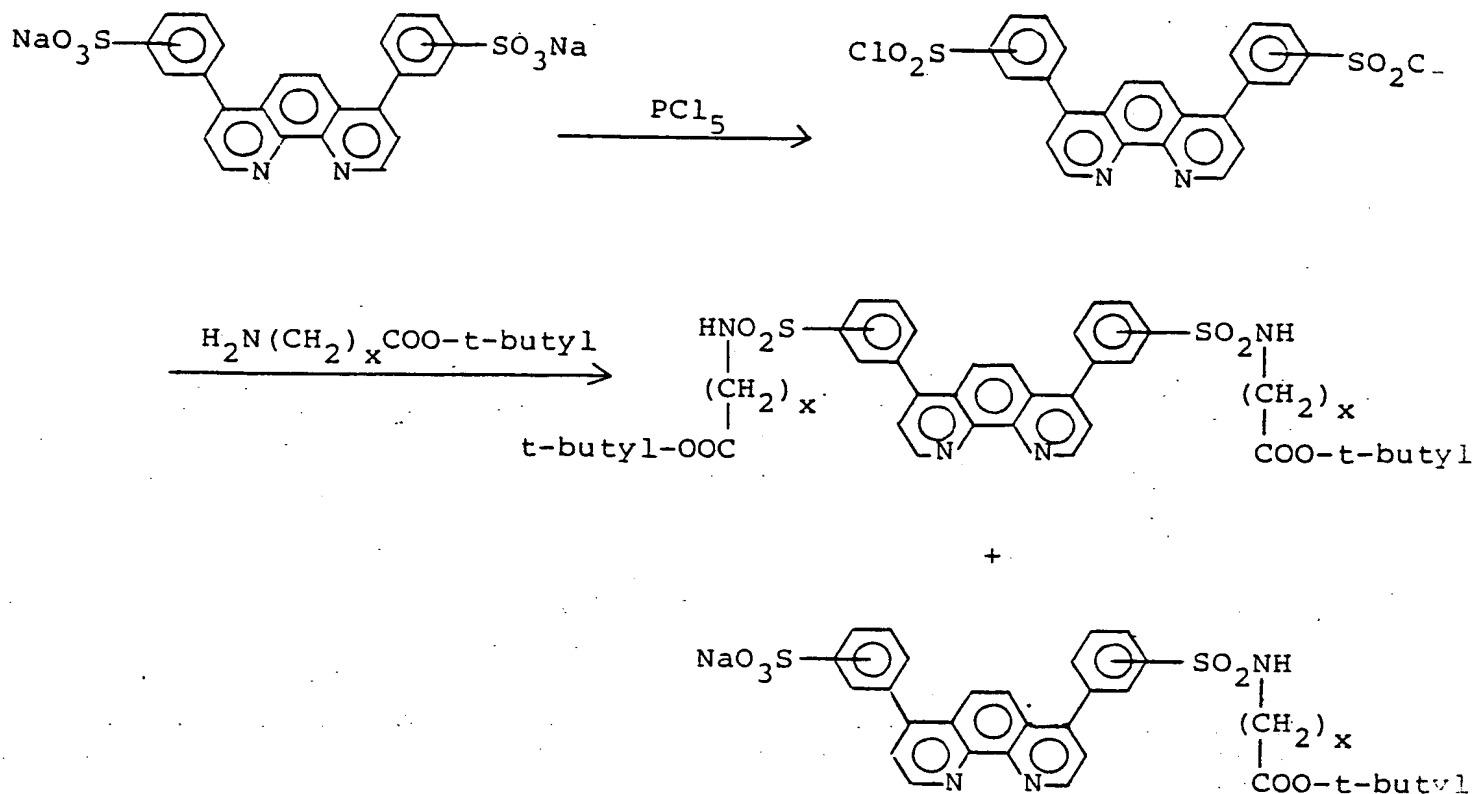
50

55

60

65

4



Bei dieser Reaktion entsteht neben dem Disulfonamid als Nebenprodukt immer auch noch das Monosulfonamid.

Die Verseifung der t-Butylester erfolgt erst nach der Synthese der entsprechenden Ru-Komplexe.

b) $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$ bzw. $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$

Die Synthese dieser Liganden mit Valeriansäure bzw. Capronsäure als Linking-Gruppe erfolgt mittels Skraup'scher Reaktion (vgl. F.H. Case und P.F. Strohm; J.Org.Chem. 27, 1641 (1962)) aus 4-Phenyl-8-amino-chinolin (vgl. F.H. Case; J.Org.Chem. 16, 1541 (1951)) und den p

35

-[β -Chlorpropionyl]-Derivaten der entsprechenden ω -Phenylfettsäuremethylester, wobei die letzteren durch Acylierung des 5-Phenyl valeriansäuremethylester (Fluka) bzw. des 6-Phenylcapronsäuremethylesters (vgl. W.E. Truce und C.E. Olson; J. Amer. Chem.Soc. 75, 1651 (1953)) mit β -Chlorpropionylchlorid gemäss nachfolgendem Reaktionsschema erhalten werden:

40

45

50

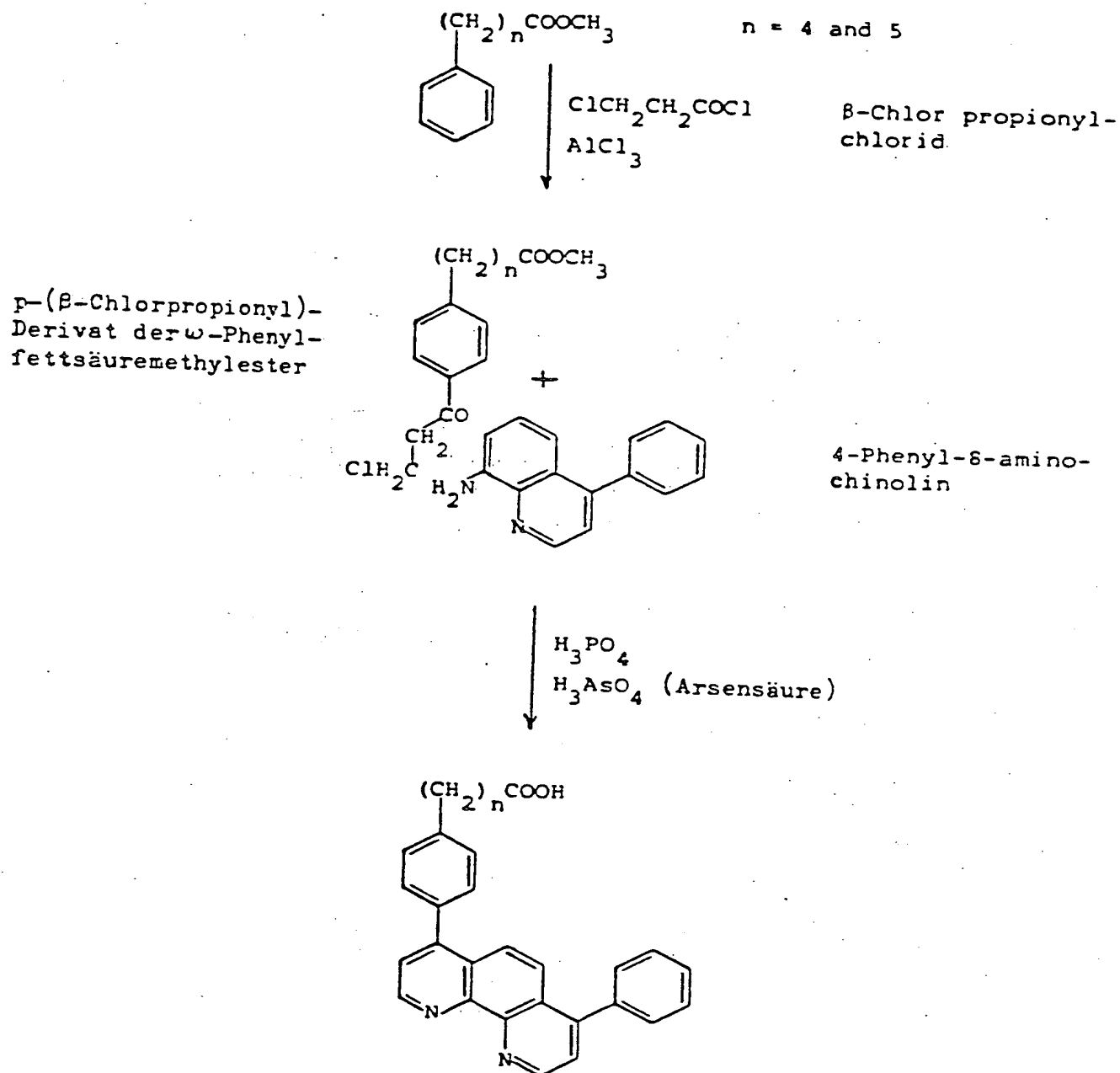
55

60

65

5

Reaktionsschema



$n = 4:$

5- $\sqrt{\text{p}}-(7\text{-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl})\text{phenyl}\sqrt{\text{Z}}$
 pentansäure $\equiv [(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) \text{ batho}]$

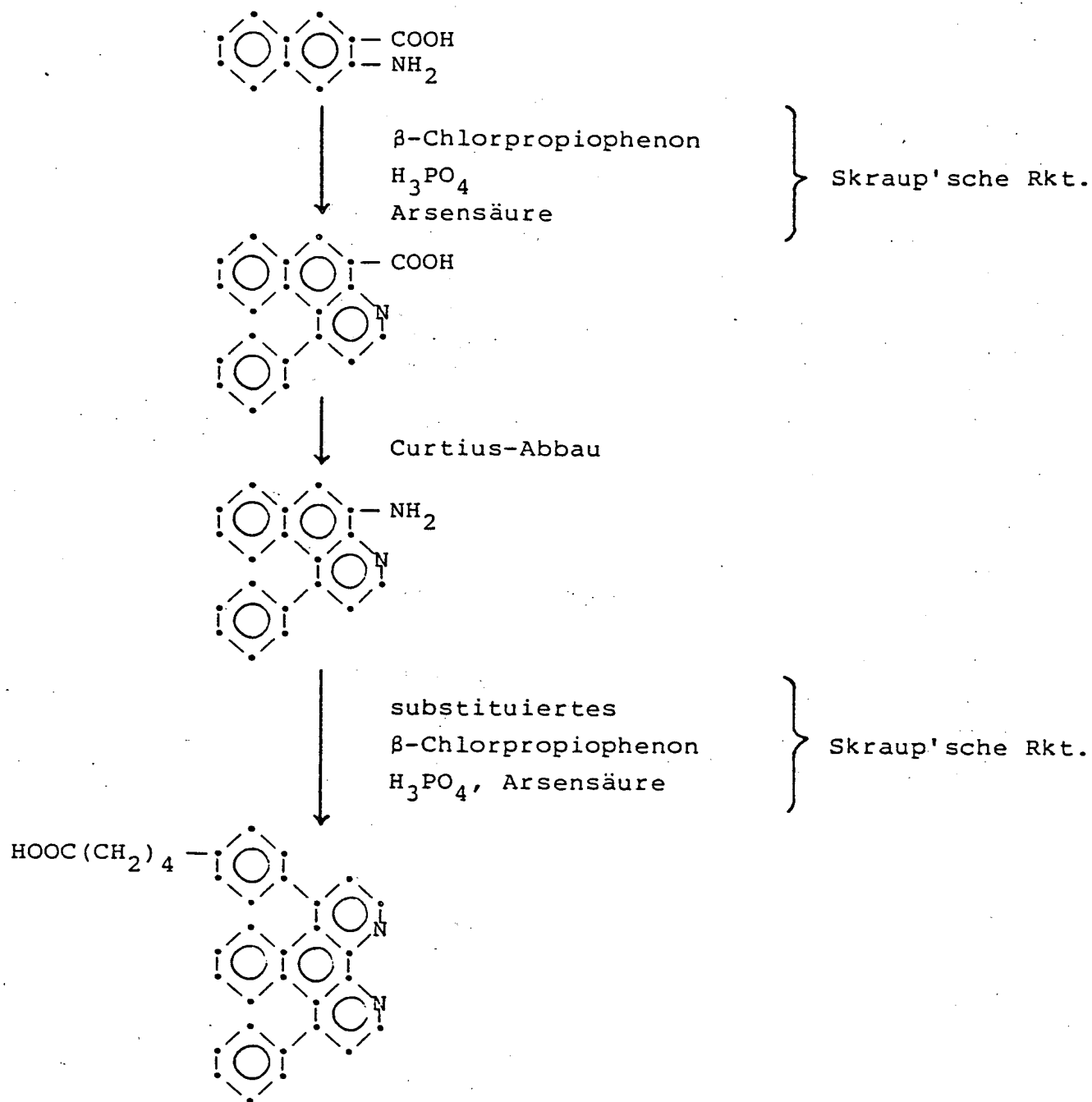
$n = 5:$

6- $\sqrt{\text{p}}-(7\text{-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl})\text{phenyl}\sqrt{\text{Z}}$
 hexansäure $\equiv [(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) \text{ batho}]$

c) $[(CH_2CH_2CH_2CH_2COOH)benzobatho]$

Die Synthese dieser Verbindung (Benzo-bathophenanthrolin-pentansäure) erfolgt über mehrere Stufen aus 2-Amino-3-naphthoesäure gemäss folgendem Schema (vgl. E. Koft und F.H. Case; J.Org.Chem. 27, 865 (1962))

5



Für die Synthese von Ru-Komplexen mit 3 identischen Liganden werden in der Literatur 2 Verfahren beschrieben:

Nach Braddock und Meyer [J.Am.Chem.Soc. 95, 3158 (1973)] erhitzt man wasserlösliches Rutheniumtrichlorid zusammen mit dem Liganden für längere Zeit in DMF, wobei sich der Komplex unter teilweiser Zersetzung des Lösungsmittels bildet.

Bevorzugt verwendet man jedoch das von Lin et al. [J.Am.Chem.Soc. 98, 6536 (1976)] beschriebene Verfahren. Dabei erhitzt man Kaliumpentachloroäquoruthenat ($K_2RuCl_5 \cdot H_2O$) in schwach saurer Umgebung mit der 3-fachen stöchiometrischen Menge an Ligand und reduziert anschliessend die Lösung mit Natriumhypophosphit.

Die Herstellung der Rutheniumkomplexe mit 2 verschiedenen Ligandtypen erfolgt nach literaturbekannten Methoden, z.B. gemäss Belser et al. Helv.Chim.Acta 63, 1675 (1980).

Im Hinblick auf die Tatsache, dass bei diesen Komplexen der Ligand L_1 von den Liganden L_2 und L_3 verschieden ist, wird ein stufenweiser Aufbau des Komplexes bevorzugt. (Selbstverständlich könnte der Komplex auch mittels einer statistischen Synthese hergestellt werden, doch ist diese Möglichkeit nicht bevorzugt, da sie schwerer kontrollierbar ist.) Dabei wird in einer ersten Stufe mit wasserlöslichem Rutheniumtrichlorid und der doppelt stöchiometrischen Menge an Ligand L_1 bzw. L_2 in Dimethylformamid (mit Lithiumchlorid als Katalysator) das Zwischenprodukt $RuL_2L_1Cl_2$ hergestellt. Dieses Zwischenprodukt wird mit dem Liganden L_3 anschliessend zum gewünschten Komplex umgesetzt.

Wird als Ligand L_1 eine Verbindung verwendet, deren reaktive Gruppe in geschützter Form vorliegt - z.B. als t-Butylester bei den Sulfonamid-Derivaten des Bathophenanthrolins - so erfolgt die Abspaltung dieser Schutzgruppe bevorzugt erst nach der Synthese des entsprechenden Ru-Komplexes.

Die Isolierung und Reinigung der gebildeten Rutheniumkomplexe erfolgt nach herkömmlichen Methoden, durch Umfällen, Säulenchromatographie oder präparative Dickschichtchromatographie.

Als immunologisch aktive Materialien, welche an die vorerwähnten Rutheniumkomplexe gekoppelt sind, kommen insbesondere Antigene, Haptene oder Antikörper (inklusive, z.B. Fab-Fragmente) in Betracht. Als Antikörper können sowohl polyklonale wie monoklonale Antikörper verwendet werden.

Ein besonders bevorzugtes immunologisch aktives Material ist ein Antikörper gegen carcinoembryonales Antigen. Ein weiterhin besonders bevorzugtes immunologisch aktives Material ist ein Antikörper gegen menschliches Choriongonadotropin, sowie ein Antikörper gegen α -Interferon.

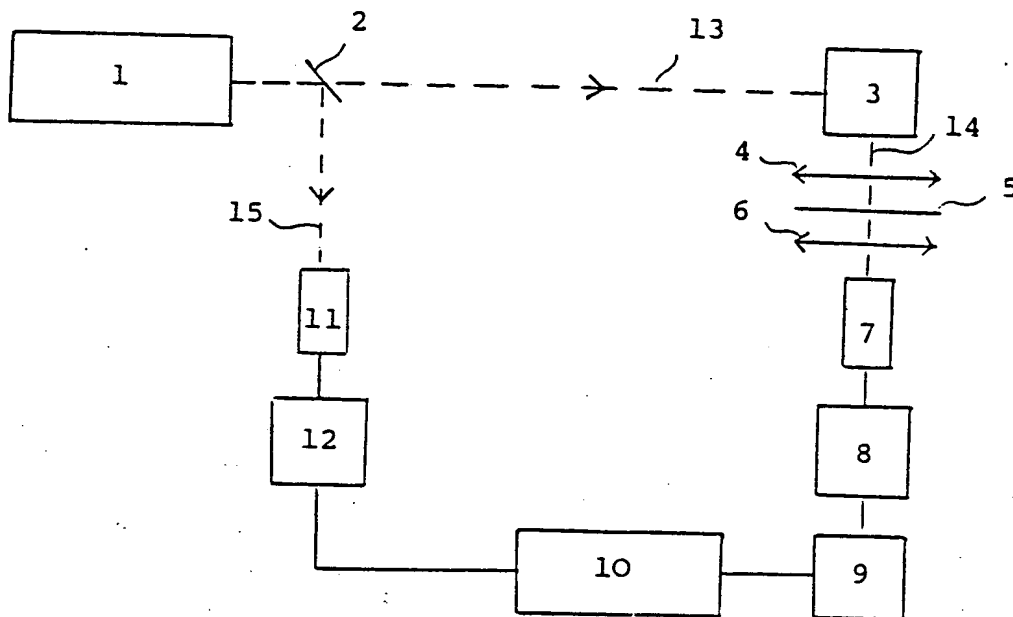
Die Kopplung des immunologischen Materials an den Rutheniumkomplex erfolgt in an sich bekannter Weise. Eine bevorzugte Kopplungsweise besteht darin, dass man den Rutheniumkomplex und das immunologisch aktive Material mit einem wasserlöslichem Carbodiimidderivat, z.B. mit N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid methyl-p-toluolsulfonat behandelt.

Die Rutheniumkomplexe gemäss vorliegender Erfindung lassen sich fluoreszenzspektroskopisch sehr empfindlich nachweisen. Sie sind bestens geeignet als Markermoleküle für hochempfindliche Fluoreszenz-Immuno-Assays. Sie sind insbesondere geeignet für einen zeitaufgelösten Fluoreszenz-Immuno-Assay, wie er beispielsweise in der DT-OS 2628158 beschrieben wird. Durch die Verwendung der Rutheniumkomplexe gemäss vorliegender Erfindung anstelle des häufig verwendeten FITC (Fluoresceinisothiocyanat) kann die Nachweisempfindlichkeit bei Fluoreszenz-Immuno-Assays verbessert werden. Dies ist insbesondere bei der Bestimmung geringer Mengen von Antigenen in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Plasma und Serum, von Vorteil. Beispiele für solche Antigene sind z.B. das carcinoembryonale Antigen (CEA), das β -HCG oder das α -Interferon.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Messapparatur für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung wird im folgenden beschrieben und anhand eines Schemas erläutert.

Eine gepulste Lichtquelle - Farbstofflaser - regt mit Lichtblitzen geeigneter Wellenlänge, $\lambda = 453 \text{ nm}$; die Messprobe zur Fluoreszenz an, wobei die Blitzdauer $t = 0,7 \text{ ns}$ viel kürzer als die Abklingzeit des fluoreszierenden Markers ist. Die Fluoreszenzstrahlung wird dann mit einer Optik durch einen Kantenfilter (Balzers 610), der die Emissionswellenlänge des Markers durchlässt, auf die Photokathode eines Photomultipliers geführt. Die einzelnen detektierten Photonen erzeugen Strompulse, die nach Verstärkung und Normierung digital gezählt werden (Photon-counting-Methode). Ueber eine Photodiode steuert das anregende Blitzlicht gleichzeitig eine Torschaltung, welche nach einer einstellbaren Verzögerungszeit $\delta = 2 \mu\text{s}$ den Zähler startet und nach einer einstellbaren Öffnungszeit des Messfensters $\Delta t = 3 \mu\text{s}$ den Zählprozess wieder stoppt. Die Verzögerungszeit Δ wird so gewählt, dass in ihr Streulichteffekte sowie die Backgroundfluoreszenz praktisch vollständig abgeklungen sind. Auf diese Art wird die Anzahl gezählter Pulse proportional zu der Markerfluoreszenzintensität, welche separat vom Background gemessen wird.

Schematische Darstellung der Messapparatur



1. Lichtquelle
2. Quarzplatte
3. Probe
4. Sammellinse
5. Kantenfilter
6. Fokussierlinse
7. Photomultiplier

8. Verstärker
9. Diskriminator
10. Zähler
11. Photodiode
12. Torschaltung
13. Anregungs-Lichtblitz
14. Fluoreszenzlicht
15. Lichtblitz zur Steuerung der Torschaltung (Trigger)

Beispiel 1

Herstellung von Bathophenanthrolindisulfochlorid

2,2 g getrocknetes Bathophenanthrolindisulfonsäure-Dinatriumsalz (Fluka) werden mit 3,1 g PCl_5 und 750 μl POCl_3 in einem 500 ml Rundkolben gut durchmischt. Der Kolben wird, versehen mit einem Rückflusskühler und einem Calciumchloridrohr, 2,5 Stunden lang in einem Ölbad auf 110°C erhitzt. Absublimiertes PCl_5 , das sich an den kühleren Stellen des Kolbens niedergeschlagen hat, wird zwischendurch abgekratzt. Anschliessend zieht man am Wasserstrahlvakuum bei 110°C das nicht umgesetzte PCl_5 sowie das POCl_3 innerhalb von 5 Stunden vollständig ab.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur behandelt man das rohe Sulfochlorid zunächst kurz mit 150 ml Benzol, die verworfen werden (um Spuren von Verunreinigungen zu entfernen). Anschliessend wird es zweimal mit je 150 ml Chloroform extrahiert, wobei jeweils 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt wird.

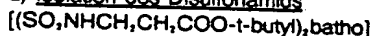
Die vereinigten Chloroformextrakteengt man am Vakuum ein. Das zurückbleibende Sulfochlorid wird dann 4 Stunden lang am Vakuum bei 110°C getrocknet (Ausbeute: 1,8 g).

Herstellung von Sulfonamiderivaten des Bathophenanthrolins mit dem t-Butylester des β -Alanins

$[(\text{SO}_2\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-COO-t-butyl})_2\text{batho}]$ und
 $[(\text{SO}_2\text{Na})(\text{SO}_2\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-COO-t-butyl})_2\text{batho}]$
 1,32 g β -Alanin-t-butylester und 10,5 ml Triäthylamin werden in 50 ml Chloroform aufgelöst. Zu dieser Lösung gibt man unter starkem Rühren innerhalb von 10 Minuten 2,0 g festes Bathophenanthrolindisulfochlorid. Nach 5-stündigem Rühren bei Zimmertemperatur lässt man das Reaktionsgemisch 4 Tage lang im Dunkeln stehen. Anschliessend zieht man bei $40\text{-}50^\circ\text{C}$ am Vakuum das Lösemittel sowie das Triäthylamin ab. Zur vollständigen Entfernung des Triäthylamins versetzt man den Rückstand mit 200 ml Chloroform und zieht dieses am Vakuum wieder ab. Dieses Verfahren wird insgesamt fünfmal durchgeführt, bis das Produkt keinen Geruch mehr nach Triäthylamin aufweist.

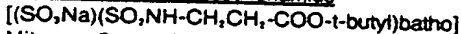
Die Reinigung des Rückstandes erfolgt durch Chromatographie über SiO_2 . Sie führt zu 2 Produkten.

a) Isolation des Disulfonamids



Mit 8 l Aceton eluiert man dabei zunächst das praktisch reine Disulfonamid. Ausbeute: 900 mg.

b) Isolation des Monosulfonamids



Mit 3 l eines Gemisches aus Chloroform/Methanol/Wasser (7/3/0,5) eluiert man eine weitere Zone, die aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften ein Phenanthrolinderivat sein muss. Nach NMR handelt es sich dabei um das Monosulfonamid der Bathophenanthrolindisulfonsäure, das wahrscheinlich durch teilweise Hydrolyse des Bathophenanthrolindisulfoclorids bei der Reaktion hat entstehen können (Ausbeute: 1,2 g Rohprodukt).

Zur weiteren Reinigung löst man das Rohprodukt in 150 ml Chloroform und schüttelt diese Lösung insgesamt dreimal mit je 100 ml Wasser aus. Anschliessend wird das Monosulfonamid noch zweimal umgefällt. Hierzu löst man die Verbindung in 50 ml Methanol/Chloroform (3/1) und fällt sie wieder durch langsames Zutropfen von 200 ml Aether aus. Ausbeute: 360 mg.

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-1]

$\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]_2(\text{PF}_6)_2$,
18,7 mg Kaliumpentachloroäquoruthenat
($\text{K}_2\text{RuCl}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) werden bei 60° in 2 ml Wasser aufgelöst, dem vorher noch 1 Tropfen 6N HCl zugesetzt worden war. Zu dieser Lösung gab man die 3-fache stöchiometrische Menge an Ligand (95,8 mg tert-Butylester gemäss b) gelöst in 1 ml DMF) und erhitzte das Gemisch 2,5 Stunden lang unter N_2 am Rückfluss.

Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wird der entstandene Ru^{3+} -Komplex mit 250 μl einer 1 molaren NaH_2PO_4 -Lösung zum entsprechenden Ru^{2+} -Komplex reduziert und dann nochmals für 2 Stunden am Rückfluss gekocht.

Anschliessend filtrierte man die Lösung, versetzte sie mit 900 μl einer 10%igen wässrigen Ammoniumhexafluorophosphatlösung und lässt sie über Nacht bei 4°C stehen. Dabei fällt der Komplex aus.

Nach dem Abnutschen wird er mittels präparativer Dickschichtchromatographie (4 Kieselgel-Platten, Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3:0,5) gereinigt.

Eine vordere rote Zone wird isoliert (50 mg reines Produkt) und zur Verseifung mit 5 ml Trifluoressigsäure bei Zimmertemperatur versetzt. Nach 1 Stunde wurde die Trifluoressigsäure am Wasserstrahlvakuum abgezogen.

Beispiel 2

Herstellung von $\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})\text{batho}]\text{Cl}$

627 mg $\text{RuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 568 mg LiCl und 3,26 g Bathophenanthrolindisulfonsäure-diNa-Salz (Fluka) werden in 8 ml DMF 6 Stunden lang am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur versetzt man die Reaktionslösung langsam mit 60 ml Aceton und lässt sie dann 20 Stunden lang bei 4°C stehen. Dabei fällt das violette Rohprodukt aus. Dieses wird abgenutscht und gut mit Aceton gewaschen. Eine erste Reinigung erfolgt dann durch Umfällen. Hierzu löst man das Rohprodukt in 50 ml Methanol und fällt es anschliessend wieder mit 500 ml

Aceton/Aether (1/1) aus. Dieses Verfahren wird wiederholt. Die weitere Reinigung erfolgt durch Chromatographie über SiO_2 . Mit 5 l Chloroform/Methanol/Aceton (4/3/3) eluiert man 600 mg praktisch reines Produkt (Ausbeute: 600 mg).

Herstellung des gemischten Komplexes $\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})\text{batho}][(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO-t-butyl})\text{batho}]\text{Cl}$

76,2 mg $\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})\text{batho}]\text{Cl}$ werden in einem Gemisch aus 1 ml Wasser und 4 ml Methanol gelöst und mit 41,0 mg $[(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO-t-butyl})\text{batho}]$ (vgl. Beispiel 1a) (gelöst in 3 ml Chloroform) vermischt. Dieses Reaktionsgemisch wird 3 Stunden lang unter N_2 am Rückfluss erhitzt, wobei eine orange-rote Lösung entsteht. Anschliessend wird das Lösemittel durch Einblasen von N_2 und leichtem Erwärmen zu etwa 90% abdestilliert. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur fällt ein Teil des Produktes aus. Zur Reinigung löst man das Produkt in 1,5 ml Methanol und 0,5 ml DMF und chromatographiert es über SiO_2 mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (7/3/0,5) (Ausbeute: 75 mg).

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-2] $\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})\text{batho}][(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]\text{Cl}$

Verseifung des t-Butylesters. Hierzu werden 55 mg $\text{Ru}[(\text{SO}_2\text{Na})\text{batho}][(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COO-t-butyl})\text{batho}]\text{Cl}$ in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst. Das Reaktionsgemisch lässt man 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen und zieht dann am Wasserstrahlvakuum bei 40°C die Trifluoressigsäure ab.

Das Rohprodukt wurde zunächst durch Säulenchromatographie über SiO_2 gereinigt. Laufmittel:

- 300 ml Chloroform/Aceton/Methanol (4/3/3)
- 500 ml Chloroform/Methanol/Wasser (50/50/2)
- 500 ml Chloroform/Methanol/Wasser (50/50/5)
- 250 ml Chloroform/Methanol/Wasser (50/50/10)
- 100 ml Methanol/Wasser (10/1)
- 100 ml Methanol/Wasser (1/1)

Die endgültige Reinigung erfolgt mittels präparativer Dickschichtchromatographie. 40 mg des Ru-Komplexes werden hierzu in 700 μl Wasser gelöst und auf 4 PSC-Platten (SiO_2 -Platten von Merck) aufgetragen. Ueber Nacht werden diese bei 60°C getrocknet und anschliessend mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (50/50/2) chromatographiert. Die Hauptzone wird herausgekratzt und dreimal mit je 40 ml Wasser extrahiert (das Kieselgel wird dabei durch Zentrifugation abgetrennt). Nach dem Einengen werden vom Produkt noch letzte Spuren SiO_2 entfernt, indem man es in wenig Methanol löst und das ungelöste Kieselgel abzentrifugiert (Ausbeute: 38 mg).

Beispiel 3

Herstellung des Bathophenanthrolindisulfonamids mit dem t-Butylester des Glycins. [(SO,NH CH₂ COO-t-butyl), batho]

Diese Sulfonamidsynthese erfolgte analog der in Beispiel 1 beschriebenen.

Ansatz: Glycin-t-butylester Dibenzolsulfimidsalz (10,3 g), Triäthylamin (28 ml) und Bathophenanthrolindisulfochlorid (4,2 g).

Ausbeute: 4,9 g [(SO,NH CH₂COO-t-butyl),batho]

Herstellung des gemischten Komplexes. Ru[(SO₂Na),batho],[(SO,NH CH₂ COO-t-butyl),batho]Cl₂

3,6 g Ru[(SO₂Na),batho]₂Cl₂ (siehe Beispiel 2) werden in einem Gemisch aus 160 ml Methanol und 100 ml Wasser gelöst und mit 2,01 g [(SO,NH CH₂ COO-t-butyl),batho] (gelöst in 80 ml Methanol) vermischt.

Dieses Reaktionsgemisch wird 5 Stunden lang unter N₂ am Rückfluss gekocht, wobei eine tiefrote Lösung entsteht. Nach dem Abkühlen engt man die Reaktionslösung am Vakuum auf etwa 70 ml ein und fällt den gemischten Ru-Komplex dann durch langsames Zutropfen von 1,4 l Aceton aus.

Zur weiteren Reinigung wird das abgenutzte Rohprodukt zweimal umgefällt. Man löst hierzu den Niederschlag in etwa 150 ml MeOH/H₂O/CH₂Cl₂ (2:1:0,3) und fällt den Komplex dann wieder aus durch langsames Zutropfen von 1,5 l Aceton.

Zum Schluss wird das Produkt noch zweimal über Kieselgel chromatographiert mit dem Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (7:3:0,5). Nach einer weiteren Umfällung analog oben erhält man ein reines Produkt. Ausbeute: 3,0 g rotes Pulver.

Verseifung des t-Butylesters zum label [RC-3] Ru[(SO₂Na),batho],[(SO,NH CH₂COOH),batho]Cl₂

500 mg Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NHCH₂COO-t-butyl),batho]Cl₂ werden in 40 ml Trifluoressigsäure dispergiert. Nach 2,5-stündigem Rühren bei RT wird die Trifluoressigsäure am Vakuum abgezogen. Den Rückstand löst man in einem Gemisch aus 1 ml DMF und 3 ml Wasser. Durch langsames Zutropfen von 500 ml Aceton/MeOH (8:2) fällt man das Komplex wieder aus.

Dieser Umfällprozess wird noch zweimal wiederholt, dann trocknet man das rote Pulver bei 70°C am Vakuum. Ausbeute: 420 mg.

Beispiel 4

Herstellung des Bathophenanthrolindisulfonamids mit dem t-Butylester der 4-Aminobuttersäure

[(SO,NHCH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]

Diese Sulfonamidsynthese erfolgte analog der in Beispiel 1 beschriebenen.

Ansatz: 4-Aminobuttersäure-t-butylester (1,57 g) Triäthylamin (17 ml) und Bathophenanthrolindisulfochlorid (2,1 g). Ausbeute: 1,3 g [(SO,NH CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]

Herstellung des gemischten Komplexes

Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]Cl₂

Diese Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Beispiel 3.

Ansatz: 1,28 g Ru[(SO₂Na),batho]₂Cl₂ und 0,775 g [(SO,NH CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]. Ausbeute: 1,65 g rotes Pulver.

Verseifung des t-Butylesters zum label [RC-4]

Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂COOH),batho]Cl₂

Ansatz: Verseifung von 70 mg t-Butylester-Derivat Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]Cl₂ analog der Vorschrift von Beispiel 3. Ausbeute: 50 mg.

Beispiel 5

Herstellung des Bathophenanthrolindisulfonamids mit dem t-Butylester der 6-Aminocaprinsäure

[(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]

Diese Sulfonamidsynthese erfolgte analog der in Beispiel 1 beschriebenen.

Ansatz: 6-Aminocaprinsäure-t-butylester (2,27 g) Triäthylamin (17 ml) und Bathophenanthrolindisulfochlorid (2,1 g). Ausbeute: 1,8 g [(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho].

Herstellung des gemischten Komplexes

Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]Cl₂

Diese Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Beispiel 3.

Ansatz: 2,3 g Ru[(SO₂Na),batho]₂Cl₂ und 1,49 g [(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]. Ausbeute: 2,8 g rotes Pulver.

Verseifung des t-Butylesters zum label [RC-5]

Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH),batho]Cl₂

Ansatz: Verseifung von 100 mg t-Butylester-Derivat Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO,NH CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-t-butyl),batho]Cl₂ analog der Vorschrift von Beispiel 3. Ausbeute: 85 mg.

Beispiel 6

Herstellung des gemischten Komplexes

Ru[(SO₂Na),batho]₂[(SO₂Na)(SO,NH CH₂COO-t-butyl)batho]Cl₂

Diese Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Beispiel 3.

Ansatz: 102 mg Ru[(SO₂Na),batho]₂Cl₂ und 51 mg [(SO₂Na)(SO,NH CH₂CH₂COO-t-butyl)batho] (siehe Beispiel 1). Ausbeute: 105 mg rotes Pulver.

Verseifung des t-Butylesters zum Label [RC-6]

$\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2[(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_3\text{NH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}(\text{batho})]\text{Cl}$

Ansatz: Verseifung von 105 mg t-Butylester-Derivat $\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2[(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_3\text{NH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO-tbutyl}(\text{batho})]\text{Cl}$, analog der Vorschrift von Beispiel 3. Reinigung erfolgt durch präparative Dickschichtchromatographie (Kieselgel-Platten, Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Aceton}$ (4:3:3)). Ausbeute: 32 mg.

Beispiel 7Synthese von 5-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-pentansäuremethyl-ester

In einem Rührkolben mit Rückflusskühler werden 9,3 g AlCl_3 , 10 ml CS_2 und 1,98 ml β -Chlorpropionylchlorid vorgelegt. Zu diesem Gemisch lässt man bei Zimmertemperatur innert 5 Minuten 3,61 g 5-Phenylvaleriansäure zutropfen (nachgespült wird mit 2 ml CS_2). Das Reaktionsgemisch wird anschliessend noch 15 Minuten weiter gerührt, leicht erwärmt und dann abgekühlt.

Dann pipettiert man das Reaktionsgemisch in eine gerührte Mischung von Eis, Wasser und Äther. Die organische Phase wäscht man mit Bicarbonatlösung und Wasser neutral. Nach dem Trocknen über MgSO_4 zieht man das Lösemittel ab. Dabei erhält man 5,03 g kristallines Produkt.

Synthese von 5-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-pentansäure

$[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$

In einem Rührkolben werden unter Argon 2,54 g 4-Phenyl-8-aminochinolin, 11,5 ml H_3PO_4 (85%ig) und 2,3 ml Arsensäurelösung (80%ige H_3AsO_4) vorgelegt. Zum Lösen des Chinolins erhitzt man das Gemisch auf 120°C. Dann fügt man innerhalb von 5 Minuten noch 4,56 g p-[β -Chlorpropionyl]-5-phenylvaleriansäuremethylester hinzu. Anschliessend heizt man das Reaktionsgemisch unter Rühren innerhalb von 10 Minuten auf 140°C auf und lässt es auf dieser Temperatur noch 1 Stunde.

Zur Aufarbeitung kühlt man das Reaktionsgemisch ab und pipettiert es in ein gerührtes Gemisch von 50 ml Wasser und 125 ml CH_2Cl_2 , das gut mit Eis gekühlt wird. Durch Zufügen von Natronlauge bringt man den pH-Wert auf 5. Dabei geht die Substanz in die organische Phase über.

Nach dem Abdampfen des Lösemittels erhält man ein Rohprodukt, das neben dem Methylester auch noch freie Säure enthält (die Reaktionsbedingungen wirken hydrolysierend). Durch Behandlung mit Diazomethan (in Äther/Methanol) wird das Gemisch wieder vollständig in den Methylester überführt.

Nach zweimaliger Chromatographie mit Essigester an Alox III (mit 1,5% H_2O noch zusätzlich desaktiviert) erhält man 3,022 g Methylester.

Zur Verseifung löst man diesen in 20 ml Äthanol auf, versetzt die Lösung mit Natronlauge (0,950 g NaOH gelöst in 5 ml H_2O) und erhitzt sie unter Argon für 2 Stunden auf 80°C. Die abgekühlte Lösung wird in ein $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ Gemisch gegeben, dann der pH-Wert der Lösung mit 85%iger H_3PO_4 auf 4-5 eingestellt und anschliessend das Produkt extrahiert.

Das eingeengte CH_2Cl_2 -Extrakt wird aus Benzol umkristallisiert, dabei erhält man 1,35 g Produkt. Aus der eingeengten Mutterlauge erhält man durch Umkristallisieren aus Äthanol noch weitere 0,338 g Produkt.

Gesamtausbeute 1,688 g Säure (kristallisiert ohne Lösemittel), Fpkt. 234-235°C.

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-7]

$\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]\text{Cl}$
Zu einer Lösung von 102,4 mg $\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 4 ml Methanol und 8 ml Wasser gibt man 34,6 mg 5-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-pentansäure aufgelöst in 2 ml Methanol. Dieses Gemisch wird 3 Stunden lang unter N_2 am Rückfluss erhitzt, wobei eine orange-rote Lösung entsteht.

Anschliessend entfernt man den grössten Teil des Lösungsmittels durch Einblasen von N_2 . Der Rest wird dann vollends mit dem Rotationsverdampfer abgezogen.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Dickschichtchromatographie. Der Komplex wird hierzu in wenig Wasser aufgelöst und auf 6 PSC-Platten (SiO_2 -Platten von Merck) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Platten bei 70°C chromatographiert man mit dem Laufmittel Chloroform/Aceton/Methanol (4/3/3).

Das mit Wasser extrahierte Hauptzonenprodukt wurde noch dreimal einer präparativen Dickschichtchromatographie unterworfen, wobei folgende Laufmittel verwendet wurden: Aceton/Wasser (9/1), dann Aceton/Wasser (8,5/1,5) und schliesslich Chloroform/Methanol/Wasser (50/50/2).

Zur Entfernung von letzten Spuren SiO_2 löst man das extrahierte Produkt in wenig Methanol und zentrifugiert das ungelöste Kieselgel ab. Aus 1 ml methanolischer Lösung wurde dann das Produkt mit 50 ml Aceton ausgefällt. Ausbeute: 42,6 mg (rotes Pulver).

Beispiel 8Synthese von 5-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-hexansäuremethyl-ester

In einem Rührkolben mit Rückflusskühler werden 17,2 g AlCl_3 , 18,5 ml CS_2 und 3,6 ml β -Chlorpropionylchlorid vorgelegt. Zu diesem Gemisch lässt man bei Zimmertemperatur innert 10 Minuten 7,06 g 6-Phenylcapronsäuremethylester zutropfen (nachgespült wird mit 4 ml CS_2). Das Reaktionsgemisch wird anschliessend noch 15 Minuten weiter gerührt, leicht erwärmt und dann abgekühlt.

Dann pipettiert man das Reaktionsgemisch in eine gerührte Mischung von Eis, Wasser und Äther. Die organische Phase wäscht man mit Bicarbonatlösung und Wasser neutral. Nach dem Trocknen über MgSO_4 zieht man das Lösungsmittel ab. Dabei erhält man 10,2 g kristallines Produkt.

Synthese von 5-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-hexansäure

$[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$

In einem Rührkolben werden unter Argon 5,90 g 4-Phenyl-8-aminochinolin, 27 ml H_3PO_4 (85%ig) und 5,35 ml Arsensäurelösung (80%ige H_3AsO_4) vorgelegt. Zum Lösen des Chinolins erhitzt man das Gemisch auf 120°C.

Dann fügt man innerhalb von 5 Minuten noch 11,15 g p-[β -Chlorpropionyl]-6-phenylcapronsäuremethylester hinzu. Anschliessend erhitzt man das Reaktionsgemisch unter Rühren innerhalb von 10 Minuten auf 140°C und lässt es auf dieser Temperatur noch 1 Stunde.

Zur Aufarbeitung kühlt man das Reaktionsgemisch ab und pipettiert es in ein gerührtes Gemisch von 100 ml Wasser und 250 ml CH_2Cl_2 , das gut mit Eis gekühlt wird. Durch Zufügen von Natronlauge (etwa 2/3 einer Lösung aus 45 g NaOH in 200 ml Wasser) bringt man dann den pH-Wert auf 5. Dabei geht die Substanz in die organische Phase über.

Nach dem Abdampfen des Lösemittels erhält man 15,76 g dickflüssiges Öl, das neben dem Methylester auch noch freie Säure enthält (die Reaktionsbedingungen wirken hydrolysierend). Durch Behandlung mit Diazomethan (in Äther/Methanol) wird das Gemisch wieder vollständig in den Methylester überführt. Dieser wird mit Essigester an 350 g Alox III (mit 1% H_2O noch zusätzlich deaktiviert) chromatographiert (Fraktionen à 120 ml). Reines Produkt enthalten die Fraktionen 5 bis 9.

Die Fraktionen 3, 4 und 10 sind dagegen noch verunreinigt. Sie werden nochmals mit Essigester über Aluminiumoxid chromatographiert (wie vorher beschrieben). Aus den reinen Fraktionen der beiden Chromatographien erhält man nach dem Abziehen des Lösemittels 6,979 g Methylester.

Zur Verseifung löst man den Ester in 45 ml Äthanol auf, versetzt diese Lösung mit Natronlauge (2,24 g NaOH gelöst in 11 ml H_2O) und erhitzt sie unter Argon für 2 Stunden auf 80°C. Dann zieht man am Rotationsverdampfer das Äthanol ab und nimmt den Rückstand in einem Gemisch von CH_2Cl_2 /Wasser auf. Mit 3,75 ml H_3PO_4 85%ig wird der pH-Wert auf ca. 3 eingestellt und dann das Produkt extrahiert.

Das Extrakt wird neutral gewaschen, getrocknet und bis auf 300 ml eingengt. Nach dem Zusatz von insgesamt 3,5 g Norit SX-3 rührt man die Lösung 40 Minuten lang, filtriert sie und engt sie bis auf wenig CH_2Cl_2 ein. Nun gibt man 20 ml Benzol hinzu und lässt die Substanz während 48 Stunden bei Zimmertemperatur auskristallisieren.

Durch Abnutschen, Waschen mit Benzol und Trocknen im Exsikkator erhält man 5,393 g Produkt, das im Kristall noch Benzol enthält.

Das Benzol-freie Produkt hat einen Fpkt. von 195°.

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-8]

$\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C-OOH})\text{batho}]\text{Cl}_2$

Zu einer Lösung von 384 mg $\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2\text{-Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 20 ml Methanol und 5 ml Wasser gibt man 134,2 mg 6-[p-(7-Phenyl-1,10-phenanthrolin-4-yl)phenyl]-hexansäure aufgelöst in 5,7 ml-Methanol. Dieses Gemisch wird 3 Stunden lang unter N_2 am Rückfluss erhitzt, wobei eine orange-rote Lösung entsteht.

Anschliessend entfernt man den grössten Teil des Lösemittels durch Einblasen von N_2 . Der Rest wird dann vollends mit dem Rotationsverdampfer abgezogen.

Die Reinigung des Produktes erfolgt zunächst durch zweimalige Säulenchromatographie über SiO_2 mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (7/3/0,5). Anschliessend wird der Komplex noch mittels präparativer Dickschichtchromatographie gereinigt (SiO_2 -Platten von Merck). Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (7/3/0,5).

Die Hauptzone wird nach dem Herauskratzen mit Methanol extrahiert. Ausbeute: 162 mg (rotes Pulver).

Beispiel 9

5 Herstellung der Benzobathophenanthrolinyl-pentansäure

$[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{benzobatho}]$

Die Synthese dieser Verbindung erfolgte aus 2-Amino-3-naphthoesäure mittels Skrap'scher Reaktion analog dem in Beispiel 7 angegebenen Verfahren für $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{batho}]$. Gesamtausbeute: 1,07 g.

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-9]

$\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2$

$[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{benzobatho}]\text{Cl}_2$

Diese Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Beispiel 3.

Ansatz: 1,28 g $\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2\text{Cl}_2$ und 0,561 g $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{benzobatho}]$. Ausbeute: 1,1 g rotes Pulver.

Beispiel 10

Herstellung des Ru-Komplexes [RC-10]

$\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2[(\text{COOH})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2$

Diese Synthese erfolgte analog der Vorschrift von Beispiel 3.

Ansatz: 256 mg $\text{Ru}[(\text{SO}_3\text{Na})_2\text{batho}]_2\text{Cl}_2$, 49 mg 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin und 60 mg NaHCO_3 (zum Solubilisieren des Bipyridins) in 25 ml $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2). Ausbeute: 290 mg rotes Pulver.

Beispiel 11

Markierung von anti-CEA mit dem Ru-Komplex [RC-2]

Die Kopplung des gemischten Ru-Komplexes [RC-2] an anti-CEA erfolgte mit Hilfe des wasserlöslichen Carbodiimid-Derivates

N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid methyl-p-toluolsulfonat. Da der Komplex über zwei reaktive Gruppen pro Molekül verfügt, wird molar die doppelte Menge an Carbodiimid verwendet.

Für die Kopplungsreaktion stellt man die folgenden Stammlösungen her:

1) 4,00 mg/ml Ru-Komplex [RC-2] in Wasser bei pH 4,5

2) 2,17 mg/ml anti-CEA vom Kaninchen (DAKO Code Nr. A 115, Lot 112 B) in 200 mM NaHCO_3 ; pH 8,5.

136 μl Stammlösung 1 werden mit 264 μl Wasser pH 4,5 (eingestellt mit HCl) verdünnt. Dazu gibt man 0,27 mg N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid methyl-p-toluolsulfonat und durchmischt kurz am Vortex. Nach 2 Minuten fügt man 400 μl von der anti-CEA Stammlösung 2 hinzu und durchmischt wieder gut am Vortex. Durch die Zugabe von wenig 1N HCl wird der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Dann lässt man das Reaktionsgemisch 17 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen.

Zur Abtrennung des markierten anti-CEAs wurden 500 µl des Reaktionsgemisches über eine Säule (Länge 30 cm, Durchmesser 9 mm) mit Acrylamid Gel AcA-54 von LKB chromatographiert (Laufmittel; 150 mM NaCl, 10 mM Na-phosphat, 0,02% Na₂S₂O₅, pH 7,0). Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an markiertem anti-CEA wurden vereinigt - insgesamt 5,2 ml. In dieser Lösung wurde der Gehalt an anti-CEA und an Ru-Komplex UV-spektroskopisch bestimmt (aus der optischen Dichte bei 278 nm - Absorption von anti-CEA und Ru-Komplex, sowie aus der optischen Dichte bei 445 nm - Absorption des Ru-Komplexes allein). Es wurden dabei folgende Konzentrationen erhalten:

0,66 x 10⁻⁶ M Ru-Komplex

0,58 x 10⁻⁶ M anti-CEA.

Dies entspricht einem Markierungsgrad von 1,1.

Beispiel 12

Durchführung eines Fluoreszenzimmunoassays mit CEA Standards

Zur quantitativen Bestimmung von CEA-Standards wird ein Sandwichtest mit einem monoklonalen CEA-Antikörper und einem polyklonalen CEA-Antikörper (markierte Antikörper von DAKO) wie folgt durchgeführt:

a) In die erforderliche Anzahl Teströhrchen (10 x 75 mm) werden je 0,250 ml CEA-Standardlösung (0 ng/ml CEA; 2,5 ng/ml CEA; 5 ng/ml CEA; 10 ng/ml CEA und 20 ng/ml CEA in 150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat mit 20 g/l Rinderserumalbumin) pipettiert, je eine mit monoklonalem anti-CEA sensibilisierte Polystyrolkugel (Durchmesser 6,5 mm) zugefügt und bei 37°C während 24 Stunden inkubiert. Anschliessend werden die Polystyrolkugeln dreimal mit je 2-5 ml destilliertem Wasser gewaschen und dann in Teströhrchen transferiert, die je 0,250 ml Pufferlösung mit 1 x 10⁻⁸ M markiertem Kaninchen anti-CEA enthalten (Markierungsgrad 1,1).

Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C werden die Kugeln wieder dreimal mit je 2-5 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschliessend in Teströhrchen mit je 2 ml Schwefelsäure (0,09N) transferiert. Nach 30 Minuten

pipetiert man die Schwefelsäure-Lösung in Messküvetten und misst den Gehalt an Ru-Komplex fluoreszenzspektroskopisch (Anregungswellenlänge 453 nm, Emissionswellenlänge 612 nm).

Die Messung erfolgte mit der früher beschriebenen Apparatur unter Verwendung eines Kantenfilters B 610 von Balzers, einer zeitlichen Verzögerung der Fluoreszenzmessung von 2 µsec (bezogen auf den Anregungspuls) und einer Öffnung des Messfensters von 3 µsec.

In der Tabelle I sind die Werte einer CEA-Bestimmung aufgeführt, die mit einer Reihe von CEA-Standards von Roche erhalten wurden.

Die Empfindlichkeit bei diesem zweistufigen Test beträgt 60 pg/ml CEA.

Der CEA Test konnte auch in einem Eintopfverfahren gemäss folgendem Verfahren durchgeführt werden.

b) In die erforderliche Anzahl Teströhrchen (10 x 75 mm) gibt man je 0,125 ml CEA-Standardlösung (0 ng/ml CEA; 2,5 ng/ml CEA; 5 ng/ml CEA; 10 ng/ml CEA; 20 ng/ml CEA in fötalem Kälberserum) sowie je 0,125 ml Lösung mit 2 x 10⁻⁸ M Kaninchen anti-CEA, das mit dem Ru-Komplex markiert ist (Markierungsgrad 1,25; Verdünnungspuffer pH 7,1 enthält 0,1 M Tris, 20% fötales Kälberserum 0,05% Timersol und 0,02% Tween 20). Dann fügt man noch je eine Polystyrolkugel (Durchmesser 6,5 mm sensibilisiert mit monoklonalem anti-CEA) hinzu und inkubiert bei 37°C während 24 Stunden.

Anschliessend werden die Kugeln dreimal mit je 2-5 ml destilliertem Wasser gewaschen und dann in Teströhrchen mit je 2 ml Schwefelsäure (0,09N) transferiert. Nach 30 Minuten pipettiert man die Schwefelsäure-Lösung in Messküvetten und misst den Gehalt an Ru-Komplex fluoreszenzspektroskopisch (die Messbedingungen sind identisch mit jenen von Teil a)).

Die Resultate dieser CEA-Bestimmung sind in Tabelle II zusammengestellt. Bei den Eintopfverfahren findet man eine Empfindlichkeit von 430 pg/ml CEA.

Tabelle I

Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von CEA-Standards (zweistufiges Verfahren)

Konzentration an CEA (Roche Standard Lösungen)	Rel. Fluoreszenzintensität
0 ng/ml CEA	0,071
2,5 ng/ml CEA	0,532
5 ng/ml CEA	1,041
10 ng/ml CEA	1,846
20 ng/ml CEA	4,121

Tabelle II

Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von CEA-Standards (Eintopf-Verfahren)

Konzentration an CEA (Roche Standard Lösungen)	Rel. Fluoreszenzintensität
0 ng/ml CEA	0,27
2,5 ng/ml CEA	1,21
5 ng/ml CEA	2,66
10 ng/ml CEA	5,13
20 ng/ml CEA	9,74

Beispiel 13Markierung von anti-HCG

Die Markierung von anti-HCG mit dem Ru-Komplex [RC-2] erfolgte auf gleiche Art und Weise wie jene von anti-CEA gemäss Beispiel 11.

Für die Kopplungsreaktion stellt man die folgenden Stammlösungen her:

1) 4,00 mg/ml Ru-Komplex [RC-2] in Wasser bei pH 4,5

2) 10,83 mg/ml anti-HCG vom Kaninchen (DAKO Code Nr. A 231 Lot 032 A) in 200 mM NaHCO₃, pH 8,5.

150 µl Stammlösung 1 werden mit 250 µl Wasser pH 4,5 (eingestellt mit HCl) verdünnt. Zu dieser Lösung gibt man 0,30 mg N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat und durchmischt kurz am Vortex. Nach 2 Minuten fügt man die anti-HCG-Lösung (222 µl Stammlösung 2 verdünnt mit 178 µl einer 200 mM NaHCO₃-Lösung pH 8,5) hinzu und durchmischt gut am Vortex. Mit wenig HCl wird der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Dann lässt man das Reaktionsgemisch 17 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen.

Zur Abtrennung des markierten anti-HCGs werden 500 µl des Reaktionsgemisches über eine Säule (Länge 30 cm, Durchmesser 9 mm) mit Acrylamid-Gel Aca-54 (von LKB) chromatographiert (Laufmittel: 150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, 0,02% NaN₃, pH 7,0). Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an markiertem anti-HCG werden vereinigt - insgesamt 5,2 ml. In dieser Lösung wird der Gehalt an anti-HCG und an Ru-Komplex UV-spektroskopisch bestimmt. Es werden dabei folgende Konzentrationen erhalten:

2,01 x 10⁻⁶ M Ru-Komplex

2,04 x 10⁻⁶ M anti-HCG

Dies entspricht einem Markierungsgrad von 1,0.

Beispiel 14Durchführung eines Fluoreszenzimmoassays mit β-HCG Standards

Zur quantitativen Bestimmung von β-HCG-Standards wird ein Sandwichtest mit einem monoklonalen β-HCG-Antikörper und einem polyklonalen HCG-Antikörper (markierte Antikörper von DAKO) wie folgt durchgeführt:

In die erforderliche Anzahl Teströhrchen (10 x 75 mm) gibt man je 0,050 ml β-HCG-Standardlösung (0 mIU/ml; 10 mIU/ml; 25 mIU/ml; 50 mIU/ml; 100 mIU/ml; 200 mIU/ml), 0,050 ml Lösung mit 5,12 x 10⁻⁸ M anti-HCG, das mit dem Ru-Komplex markiert ist (Markierungsgrad 1,0; Verdünnungspuffer pH 7,1 enthält 0,1 M Tris, 20% fötales Kälberserum, 0,05% Thimerosal und 0,02% Tween 20) sowie je 0,150 ml Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat mit 20 g/l Rinderserumalbumin). Dann fügt man noch je eine Polystyrolkugel (Durchmesser 6,5 mm sensibilisiert mit monoklonalem anti-β-HCG) hinzu und inkubiert bei 37°C während 16 Stunden.

Anschließend werden die Kugeln dreimal mit je 2-5 ml destilliertem Wasser gewaschen und dann in Teströhrchen mit je 2 ml Schwefelsäure (0,09N) transferiert. Nach 30 Minuten pipettiert man die Schwefelsäure-Lösung in Messküvetten und misst den Gehalt an Ru-Komplex fluoreszenzspektroskopisch (die Messbedingungen sind identisch mit jenen von Beispiel 12).

Die Resultate dieser β-HCG-Bestimmung sind in der Tabelle III zusammengestellt. Bei diesem Eintopfverfahren findet man eine Empfindlichkeit von 2,2 mIU/ml β-HCG.

Tabelle III

Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von β-HCG-Standards (Eintopf-Verfahren)

Konzentration an β -HCG (Roche Standard Lösungen)	Rel. Fluoreszenzintensität
0 mIU/ml	0,44
10 mIU/ml	0,34
25 mIU/ml	0,80
50 mIU/ml	1,56
100 mIU/ml	2,78
200 mIU/ml	5,81

Beispiel 15Markierung von anti- α -Interferon

Die Markierung von monoklonalem anti- α -Interferon (von Roche Diagnostica) mit dem Ru-Komplex [RC-2] erfolgte auf gleiche Art und Weise wie jene von anti-CEA gemäss Beispiel 11.

Für die Kopplungsreaktion stellt man die folgenden Stammlösungen her:

- 1) 3,75 mg Ru-Komplex [RC-2] in Wasser bei pH 4,5
- 2) 6,0 mg/ml monoklonales anti- α -Interferon in 200 mM NaHCO₃, pH 8,5.

Zu 400 μ l Stammlösung 1 gibt man 0,81 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid-Derivat und durchmischt kurz am Vortex.

Nach 2 Minuten fügt man 400 μ l von der anti- α -Interferon-Stammlösung 2 hinzu und durchmischt wiederum kurz am Vortex. Dann lässt man das Reaktionsgemisch 17 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen.

Zur Abtrennung des markierten anti- α -Interferons werden 500 μ l des Reaktionsgemisches über eine Säule (Länge 30 cm; Durchmesser 9 mm) mit Acrylamid-Gel ACA-54 von LKB chromatographiert (Laufmittel: 150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, 0,02% NaN₃, pH 7,0).

Die Fraktion mit dem höchsten Gehalt an markiertem anti- α -Interferon werden vereinigt - insgesamt 5,2 ml. In dieser Lösung wird der Gehalt an anti- α -Interferon und an Ru-Komplex UV-spektroskopisch bestimmt.

Man erhält dabei folgende Konzentrationen:

11,5 $\times 10^{-6}$ M Ru-Komplex

1,8 $\times 10^{-6}$ M anti- α -Interferon (monoklonal).

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 6,4.

Beispiel 1620 Durchführung eines Fluoreszenzimmunoassays mit α -Interferon Standards

Zur quantitativen Bestimmung von Interferon- α A Standards (recombinant leucocyte interferon) wird ein von Roche Diagnostica als EIA entwickelter Sandwichtest verwendet. Anstelle des Enzym-markierten zweiten Antikörpers benutzt man jedoch monoklonales anti-Interferon, das mit dem Ru-Komplex [RC-2] markiert ist (Markierungsgrad 6,4).

Die quantitative Bestimmung der verschiedenen Interferon- α A Standards erfolgte nach folgendem Verfahren (einstufiger Test):

In die erforderliche Anzahl Teströhrchen (10 \times 75 mm) gibt man je 0,100 ml Interferon- α A Standard-Lösung (0 U/ml r IFN α A; 25 U/ml r IFN α A; 50 U/ml r IFN α A; 100 U/ml r IFN α A; 150 U/ml r IFN α A; 200 U/ml r IFN α A in Normal-Human-Serum mit Thimerosal) sowie je 0,500 ml Lösung mit 5,26 $\times 10^{-10}$ M/ml monoklonalem anti- α -Interferon, das mit dem Ru-Komplex [RC-2] markiert ist (Markierungsgrad 6,4; Puffersystem: 150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat pH 7,5). Dann fügt man noch je eine Polystyrolkugel (Durchmesser 6,5 mm; sensibilisiert mit monoklonalem anti-Interferon) hinzu und inkubiert bei Zimmertemperatur (26°C) während 24 Stunden.

Anschliessend werden die Kugeln dreimal mit je 2-5 ml destilliertem Wasser gewaschen und dann in Teströhrchen mit je 2 ml Schwefelsäure (0,09N) transferiert. Nach 30 Minuten pipettiert man die Schwefelsäure-Lösung in Messküvetten und misst den Gehalt an Ru-Komplex fluoreszenzspektroskopisch. (Die Messbedingungen sind identisch mit jenen von Beispiel 12).

Die Resultate der r IFN α A Bestimmungen sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Im Bereich von 0-200 U/ml findet man annähernd eine lineare Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und der r IFN α A-Konzentration. Die Empfindlichkeit beträgt 0,46 U/ml r IFN α A.

Tabelle IV

Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von r IFN α A Standards

Konzentration an r IFN α A (Roche Standard Lösungen)	Rel. Fluoreszenzintensität
0 U/ml	0,14
25 U/ml	0,51
50 U/ml	0,89
100 U/ml	1,80
150 U/ml	2,77
200 U/ml	4,01

Beispiel 17Markierung von polyklonalem anti-HCG mit dem Ru-Komplex [RC-7]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 5,4 mg/ml Ru-Komplex [RC-7] in Wasser bei pH 4,5.

2) 6,0 mg/ml polyklonales anti-HCG vom Kaninchen (DAKO Code Nr. A 231, Lot 032A) in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion wird nach dem im Beispiel 11 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Man verwendet hierzu jeweils 400 μ l von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,56 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid.

Die markierten Antikörper wurden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-7] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an anti-HCG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

3,81 $\times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

1,87 $\times 10^{-6}$ M/l anti-HCG (polyklonal).

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 2,0.

Beispiel 18Markierung von polyklonalem anti-CEA mit dem Ru-Komplex [RC-8]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 1,71 mg/ml Ru-Komplex [RC-8] in Wasser bei pH 4,5.

2) 2,17 mg/ml polyklonales anti-CEA vom Kaninchen (DAKO Code No. A115, Lot 112B) in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion wird nach dem im Beispiel 11 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Man verwendet hierzu jeweils 400 μ l von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,19 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid.

Die markierten Antikörper wurden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-8] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an anti-CEA und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

0,43 $\times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

0,94 $\times 10^{-6}$ M/l anti-CEA

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 0,5.

Beispiel 19Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-6]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 3,6 mg/ml Ru-Komplex [RC-6] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 μ l von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,37 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-6] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

2,31 $\times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex 1,62 $\times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 1,4.

Beispiel 20Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-1]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 4,0 mg/ml Ru-Komplex [RC-1] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 μ l von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 1,11 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-1] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

10,4 $\times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

1,8 $\times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 5,8.

Beispiel 21Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-10]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 29,0 mg/ml Ru-Komplex [RC-10] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.
Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden 526 µl von der Stammlösung 1 und 400 µl von der Stammlösung 2 sowie 7,45 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-10] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

$0,81 \times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

$0,78 \times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 1,0.

Beispiel 22Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-3]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt: 1)

3,7 mg/ml Ru-Komplex [RC-3] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 µl von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,75 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-3] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

$4,41 \times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

$1,21 \times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 3,6.

Beispiel 23Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-4]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 3,81 mg/ml Ru-Komplex [RC-4] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 µl von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,75 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-4] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

$5,51 \times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

$1,17 \times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 4,70.

Beispiel 24Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-5]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 3,87 mg/ml Ru-Komplex [RC-5] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 µl von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,75 mg vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-5] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

$11,7 \times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

$1,04 \times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 11,2.

Beispiel 25Markierung von h-IgG mit dem Ru-Komplex [RC-9]

Für die Kopplungsreaktion werden die folgenden Stammlösungen hergestellt:

1) 3,45 mg/ml Ru-Komplex [RC-9] in Wasser bei pH 4,5

2) 6,0 mg/ml h-IgG in 200 mM NaHCO₃; pH 8,5.

Die Kopplungsreaktion erfolgt nach dem in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren. Dabei werden jeweils 400 µl von den Stammlösungen 1 und 2 sowie 0,375 µl vom wasserlöslichen Carbodiimid verwendet.

Die markierten Antikörper werden - wie in Beispiel 11 beschrieben - durch Gelchromatographie vom Ueberschuss an Ru-Komplex [RC-9] abgetrennt.

Die UV-spektroskopische Bestimmung des Gehaltes an h-IgG und an Ru-Komplex ergab folgende Werte:

$5,69 \times 10^{-6}$ M/l Ru-Komplex

$0,45 \times 10^{-6}$ M/l h-IgG

Dies entspricht einem Markierungsgrad MG von 12,8.

Ansprüche

1. Rutheniumkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt ist, wobei die Rutheniumkomplexe die allgemeine Formel:



aufweisen, worin L₁, L₂ und L₃ gleich oder verschieden sind und je einen bi- oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L₁, L₂ und L₃ über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

2. Rutheniumkomplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden L_1 bzw. L_2 , 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin-, Bathophenanthrolin- oder Benzbathophenanthrolin-gruppen enthalten.

3. Rutheniumkomplex nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden L_1 bzw. L_2 Bathophenanthrolin sind und mit Sulfonsäuregruppen als wasserlöslich machende Gruppen substituiert sind.

4. Rutheniumkomplex nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Sulfonsäuregruppen in Form der Salze vorliegen.

5. Rutheniumkomplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 eine 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin-, Bathophenanthrolin- oder Benzbathophenanthrolin-gruppe enthält.

6. Rutheniumkomplex nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 eine Bathophenanthrolin- oder Benzbathophenanthrolin-gruppe enthält, die mit mindestens einer Alkylengruppe mit höchstens 8 C-Atomen substituiert ist, die gegebenenfalls $-SO_2-NH-$, $-S-$, $-O-$, $-COO-$, oder $-CO-NH-$ aufweisen kann.

7. Rutheniumkomplex nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Alkylengruppe endständig mit einer $-COOH$, $-NH_2$, $-NCS$, $-J$ oder $-SO_2Hal$ Gruppe substituiert ist.

8. Rutheniumkomplex nach einem der Ansprüche 6-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 die Gruppe $-SO_2-NH(CH_2)_nCOOH$ enthält, wobei n eine ganze Zahl von 1-5 bedeutet.

9. Rutheniumkomplex nach einem der Ansprüche 6-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 die Gruppe $-(CH_2)_nCOOH$ enthält.

10. Rutheniumkomplex nach einem der Ansprüche 6-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 die Gruppe $-(CH_2)_nCOOH$ enthält.

11. Rutheniumkomplex nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand L_1 2,2'-Bipyridin ist, der mit mindestens einer Carboxylgruppe substituiert ist.

12. Rutheniumkomplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Liganden L_1 , L_2 und L_3 gleich sind und Bathophenanthrolin darstellen, die sowohl mit einer wasserlöslich machenden Gruppe als auch über eine Spacergruppe mit einer reaktiven Gruppe substituiert sind.

13. Rutheniumkomplexe nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserlöslich machende Gruppe eine Sulfonsäuregruppe ist und dass die reaktive Gruppe eine Carboxylgruppe ist, die über eine $-SO_2-NH-(CH_2)_n$ -Spacergruppe verknüpft ist.

14. Rutheniumkomplex nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass das immunologisch aktive Material ein Antigen oder Hapten ist.

15. Rutheniumkomplex nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass das immunologisch aktive Material ein Antikörper ist.

16. Rutheniumkomplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das immunologisch aktive Material ein Antikörper gegen carcinoembryonales Antigen, humanes Choriongonadotropin oder α -Interferon ist.

17. Verfahren zur Herstellung eines Rutheniumkomplexes gemäss allgemeiner Formel I von Patentanspruch 1, an den ein immunologisch aktives Material gekoppelt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man den Rutheniumkomplex gemäss allgemeiner Formel I in an sich bekannter Weise mit einem immunologisch aktiven Material koppelt.

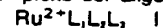
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man als Kopplungsmittel N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid methyl-p-toluolsulfonamid verwendet.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als immunologisches Material Antikörper gegen carcinoembryonales Antigen, humanes Choriongonadotropin oder α -Interferon verwendet.

20. Verwendung eines Rutheniumkomplexes nach einem der Ansprüche 1-13 in einem Fluoreszenzimmunoassay.

21. Verwendung eines Rutheniumkomplexes nach einem der Ansprüche 1-13 in einem Fluoreszenzimmunoassay mit zeitaufgelöster Fluoreszenzmessung.

22. Rutheniumkomplexe der allgemeinen Formel



worin L_1 , L_2 und L_3 gleich oder verschieden sind und je einen bi- oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L_1 , L_2 und L_3 über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

23. Rutheniumkomplexe gemäss Anspruch 22, worin die Liganden L_1 , L_2 und L_3 die in den Ansprüchen 2-13 erwähnten Bedeutungen haben.

Ansprüche für AT

1. Verfahren zur Herstellung eines Rutheniumkomplexes gemäss allgemeiner Formel



worin L_1 , L_2 und L_3 gleich oder verschieden sind und je einen bi- oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L_1 , L_2 und L_3 über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind, an den ein immunologisch aktives Material gekoppelt ist, dadurch gekennzeichnet, dass man den Rutheniumkomplex gemäss allgemeiner Formel I in an sich bekannter Weise mit einem immunologisch aktiven Material koppelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Kopplungsmittel N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid methyl-p-toluolsulfonamid verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als immunologisches Material Antikörper gegen carcinoembryonales Antigen, humanes Choriongonadotropin oder α -Interferon verwendet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑫

⑲ Anmeldenummer: 85111377.9

⑤① Int. Cl.⁴: G01N 33/533, G01N 33/574,
G01N 33/76, C07F 15/00

⑳ Anmeldetag: 09.09.85

③① Priorität: 17.09.84 CH 4433/84
10.07.85 CH 2984/85

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
23.04.86 Patentblatt 86/17

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

⑥⑥ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 05.08.87 Patentblatt 87/32

⑦① Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.
Aktiengesellschaft

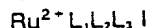
CH-4002 Basel(CH)

⑦② Erfinder: Müller, Francis
Seltisbergerstrasse 18
CH-4059 Basel(CH)
Erfinder: Schmidt, Dieter, Dr.
Redingstrasse 20
CH-4052 Basel(CH)

⑦④ Vertreter: Lederer, Franz, Dr. et al
Vanderwerth, Lederer & Riederer
Patentanwälte Lucile-Grahn-Strasse 22
D-8000 München 80(DE)

⑤④ Metallkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt werden kann bzw. ist, deren Herstellung und Verwendung.

⑤⑦ Es werden Rutheniumkomplexe beschrieben, an die ein immunologisch aktives Material gekoppelt werden kann bzw. ist. Die Rutheniumkomplexe haben die allgemeine Formel



worin L₁, L₂ und L₃ gleich oder verschieden sind und je einen bi-oder polycyclischen Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer wasserlöslich machenden Gruppe substituiert ist, und wobei mindestens einer dieser Liganden mit mindestens einer reaktiven Gruppe, gegebenenfalls über eine Spacergruppe, substituiert ist, und wobei die Liganden L₁, L₂ und L₃ über Stickstoffatome an das Ruthenium gebunden sind.

Die Liganden L₁, L₂ und L₃ enthalten beispielsweise 2,2'-Bipyridin-, 1,10-Phenanthrolin-, Benzbathophenanthrolin-oder Bathophenanthrolingruppen.

Die Spacergruppe ist beispielsweise eine Alkylengruppe mit höchstens 8 C-Atomen, die gegebenenfalls -SO₂-NH-, -S-, -O-, -COO-oder -CO-NH-aufweisen kann.

Als reaktive Gruppen, an die das immunologisch aktive Material gebunden wird kommen vorzugsweise -COOH, -J, -NH₂, -NCS oder -SO₂Hal Gruppen in Betracht.

Als immunologisch aktive Materialien, welche an die vorerwähnten Rutheniumkomplexe gekoppelt sind, kommen insbesondere Antigene, Haptene oder Antikörper, z.B. Antikörper gegen carcinoembryonale Antigen, in Betracht.

Die Rutheniumkomplexe gemäss vorliegende Erfindung lassen sich fluoreszenzspektroskopisch sehr empfindlich nachweisen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 85 11 1377

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	US-A-4 293 310 (S.G. WEBER) * Spalten 4-6,8-10; Ansprüche 1-4,19,20 *	1,2,5, 7,11, 14,15, 17,20-23	G 01 N 33/533 G 01 N 33/574 G 01 N 33/76 C 07 F 15/00
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, Band 98, Nr. 14, 4. April 1983, Seite 714, Zusammenfassung Nr. 118503t, Columbus, Ohio, US; D.S.C. BLACK et al.: "Ruthenium carbonyl complexes. I. Synthesis of [Ru(CO) ₂ (bidentate) ₂] ²⁺ complexes", & AUST. J. CHEM. 1982, 35(12), 2445-53		
A	--- US-A-4 283 382 (D.S. FRANK et al.)		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
A	--- US-A-4 341 757 (J.E. SPALLHOLZ)		G 01 N
A	--- US-A-4 374 120 (E. SOINI et al.) --- -/-		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 16-04-1987	Prüfer GRIFFITH G.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

THIS PAGE BLANK (USPTO)



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			Seite 2														
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)														
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 94, Nr. 26, 29. Juni 1981, Seite 551, Zusammenfassung Nr. 216784x, Columbus, Ohio, US; M.L. STONE et al.: "Charge transfer luminescence from ruthenium(II) complexes containing tridentate ligands", & CHEM. PHYS. LETT. 1981, 79(1), 169-73																

A	AUSTRALIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, Band 17, 1964, Seiten 325-336, East Melbourne, AU; D.A. BUCKINGHAM et al.: "Mono- and bis-(2,2'-bipyridine) and (1,10-phenanthroline) chelates of ruthenium and osmium"																

A	US-A-4 205 952 (M. CAIS)		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)														

A	JOURNAL OF INORGANIC AND NUCLEAR CHEMISTRY, Band 41, 1979, Seiten 495-502, Pergamon Press Ltd, Oxford, GB; J.L. KAHL et al.: "Preparation and identification of iridium bipyridine and phenanthroline complexes"																

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.																	
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 16-04-1987	Prüfer GRIFFITH G.														
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td><td>E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D: in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L: aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A: technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O: nichtschriftliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P: Zwischenliteratur</td><td>&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr><tr><td>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td></td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE	E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D: in der Anmeldung angeführtes Dokument	Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L: aus andern Gründen angeführtes Dokument	A: technologischer Hintergrund		O: nichtschriftliche Offenbarung		P: Zwischenliteratur	&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE	E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist																
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D: in der Anmeldung angeführtes Dokument																
Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L: aus andern Gründen angeführtes Dokument																
A: technologischer Hintergrund																	
O: nichtschriftliche Offenbarung																	
P: Zwischenliteratur	&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument																
T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze																	

THIS PAGE BLANK (USPTO)